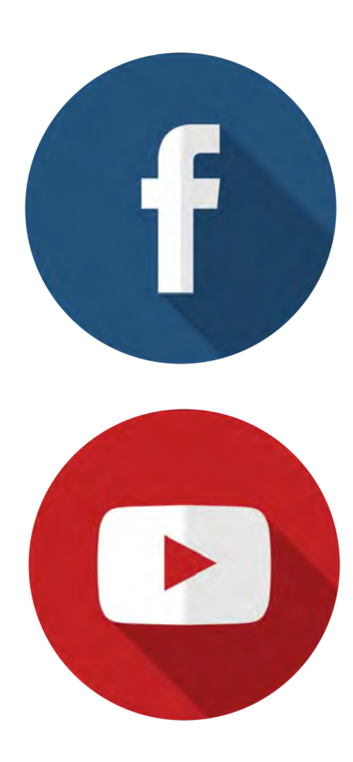
In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful







Chapitre II :

Méthodes d'étude de la cellule

Conçu par
Mme F. Foukrache

Année universitaire 2016-2017

Objectifs principaux

Objectif 1: Citer les instruments d'observation des cellules
Objectif 2: Nommer les techniques utilisées.
Objectif 3: Associer l'instrument d'observation et la technique préparatoire de l'échantillon approprié à l'objectif recherché.



Objectifs spécifiques

A - Les microscopes photoniques

1 - Le microscope photonique à fond clair

Objectif 1 :Définir la notion de pouvoir séparateur.

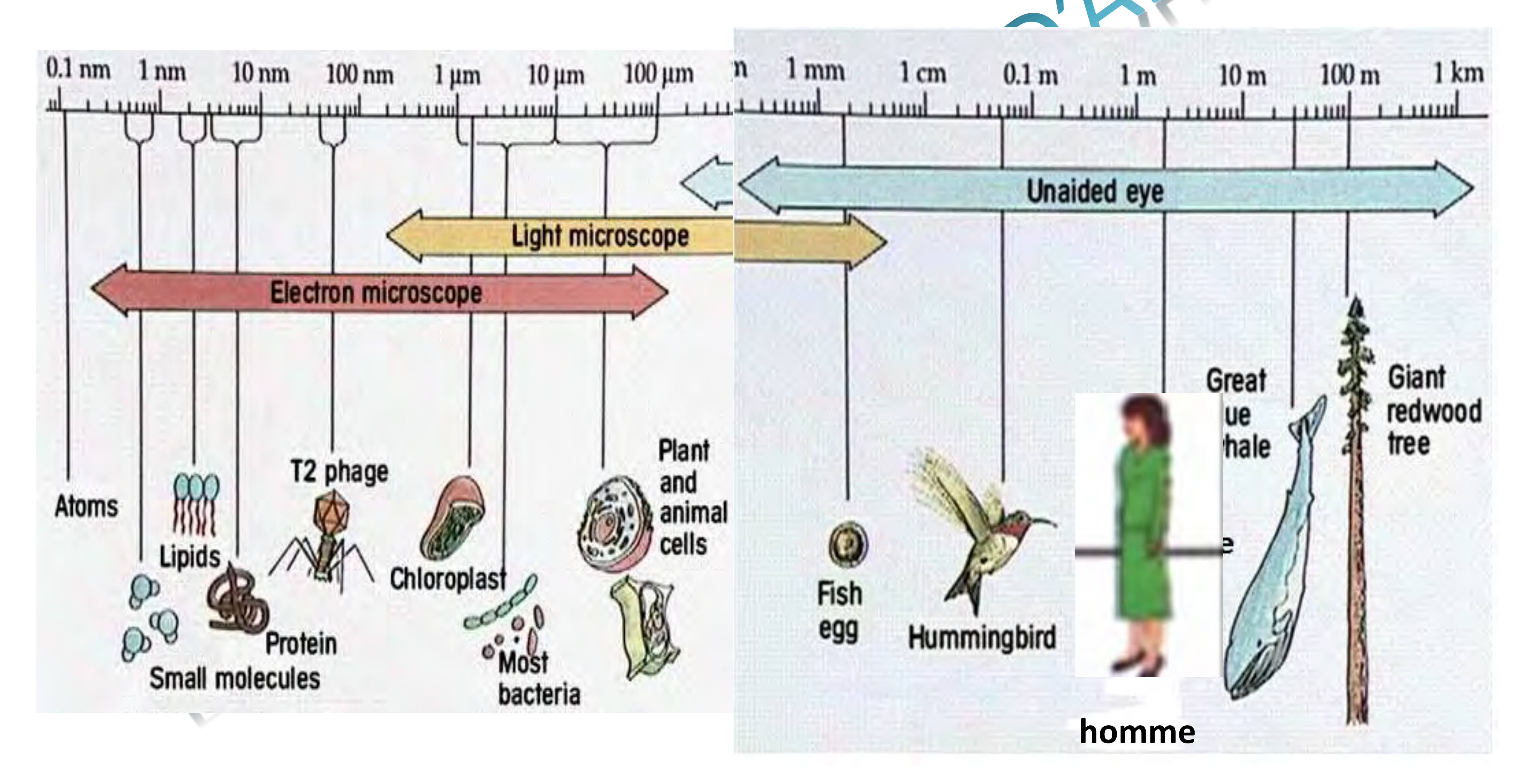
Objectif 2 :Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair(microscope optique)

Objectif 3 :Indiquer les domaines de son application.

Objectif 4 :Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair (la technique histologique).

Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur

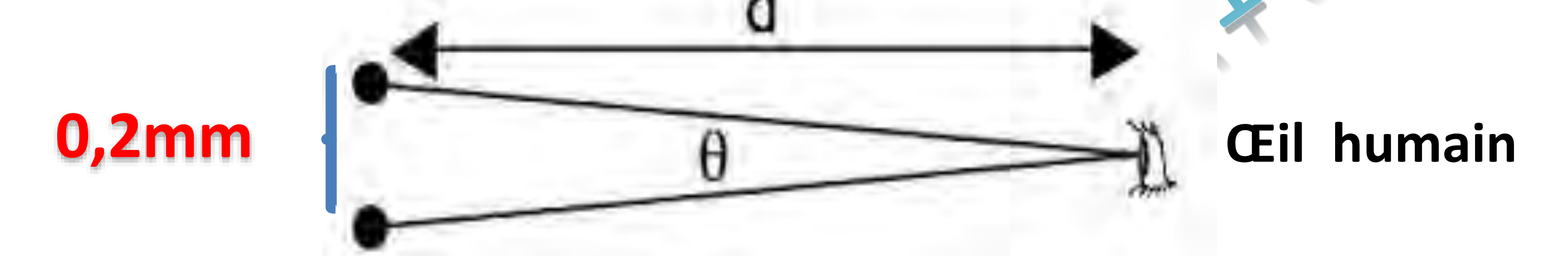
Echelle des dimensions dans le monde du vivant



Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur

Notion de pouvoir séparateur = limite de résolution

- **C'est la capacité de l'œil à distinguer nettement 2 points très rapprochés , il est égal à 0,2 mm**



- **Organismes de taille plus petite → Invisibles**
- **Nécessité d'utiliser des instruments destinés à observer de petits objets dont un système de lentilles (optiques , électroniques) fournit une image agrandie**

Ces instruments = les microscopes

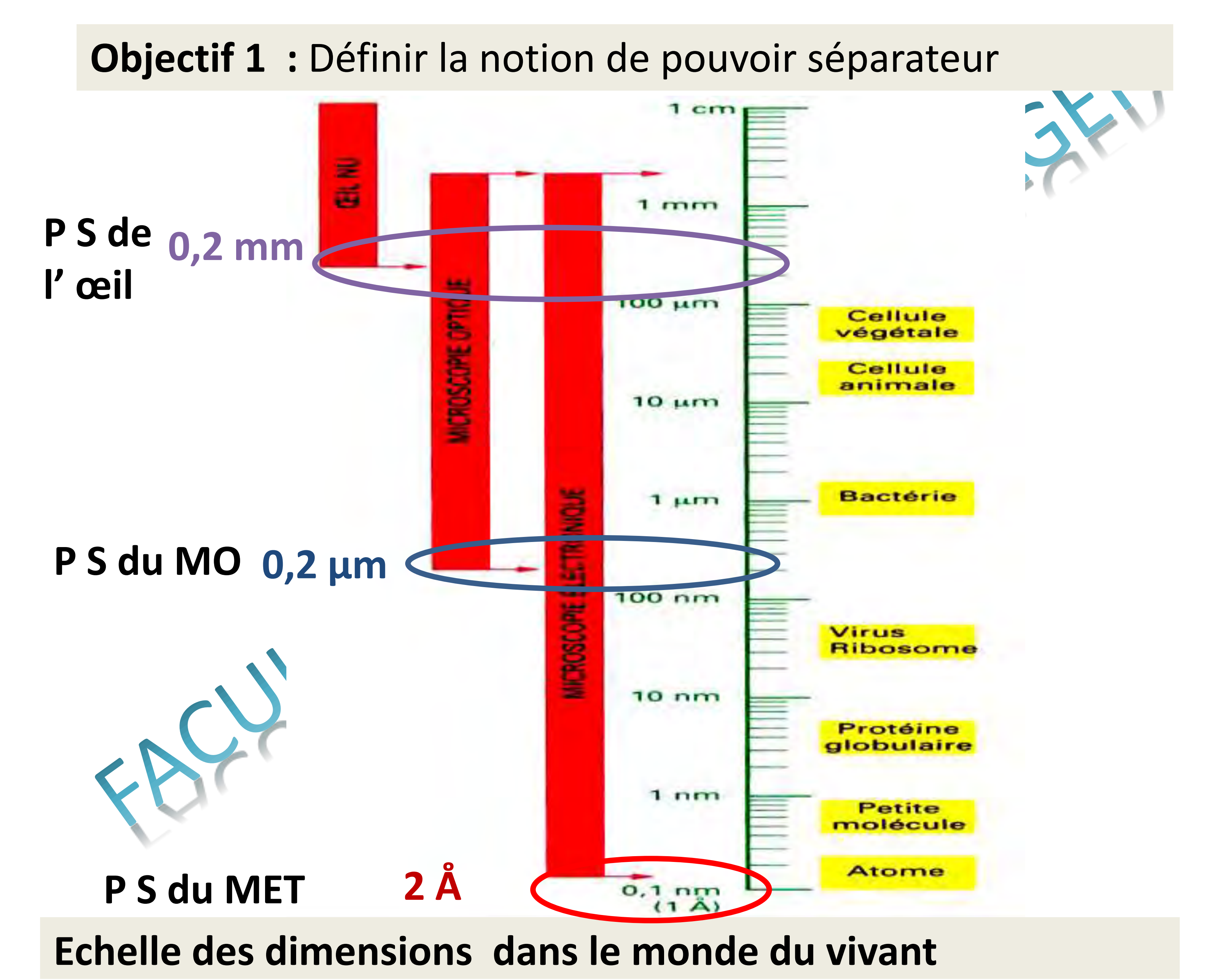
Moyens d'étude des cellules

Le microscope optique ou photonique

Le microscope électronique

Microscope = instrument qui grossit de nombreuses fois l'image des objets trop petits pour voir à l'œil nu

Objectif 1 : Définir la notion de pouvoir séparateur



Echelle des dimensions dans le monde du vivant

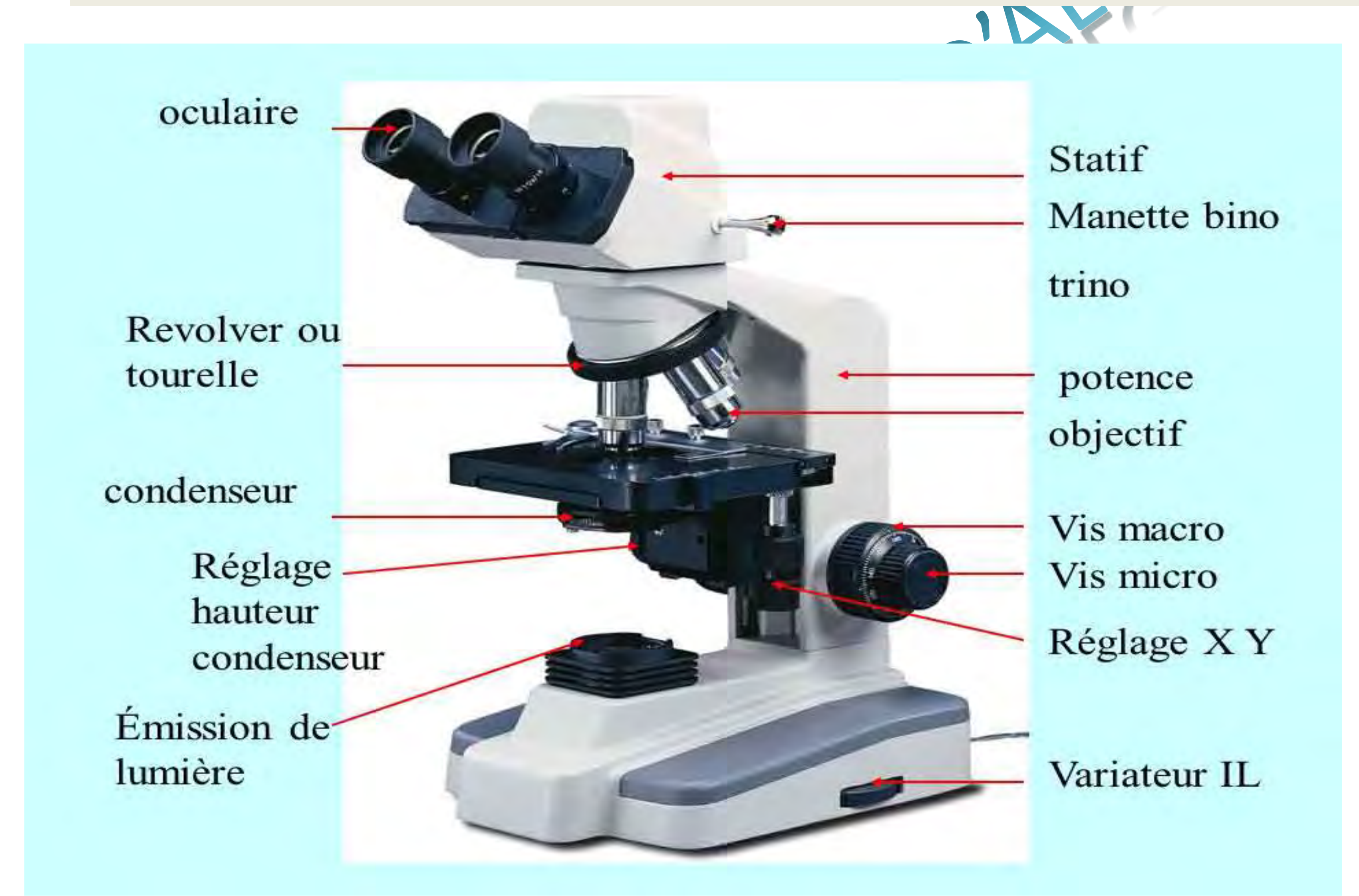
Les premiers microscopes optiques



Cuff 1760

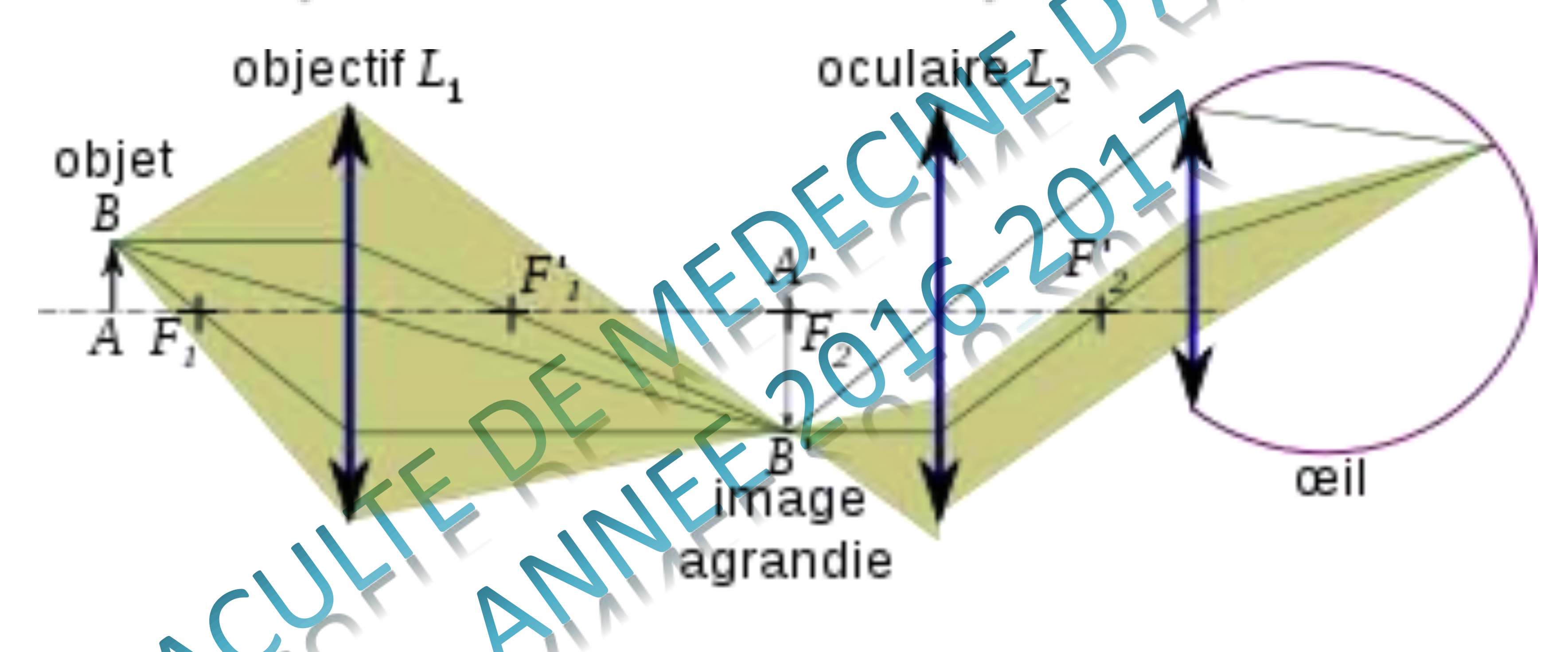
1751

Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair



Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair

Principe de la transmission des photons



Le M O est un système optique à lentilles dont le but est d'obtenir une image agrandie de l'échantillon à observer

Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair



Miroir plan

œil

Lentille oculaire

Objectif

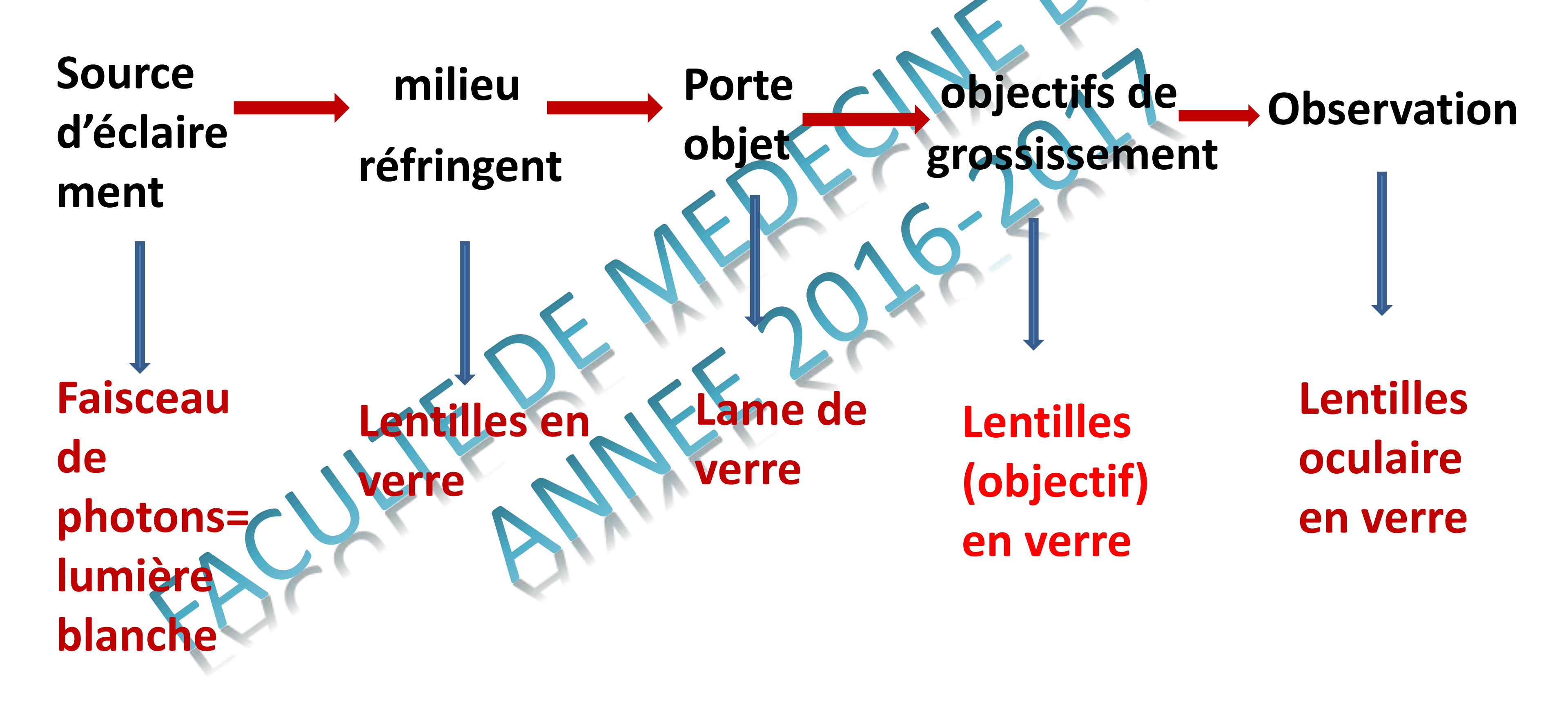
condenseur

Source de lumière=photons

Schéma montrant le chemin suivi par le faisceau de photons

Objectif 2 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fond clair

Principe de fonctionnement du M O



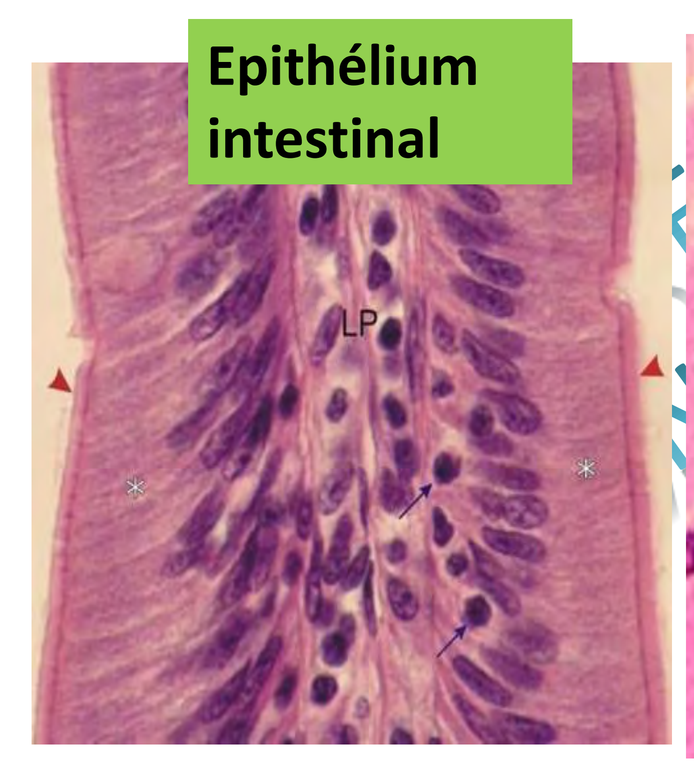
Résultat : image en couleur

Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique

Description structurale des tissus et des cellules ;

- **Taille , Forme cellulaire et tissulaire**
- **Forme et position des noyaux**

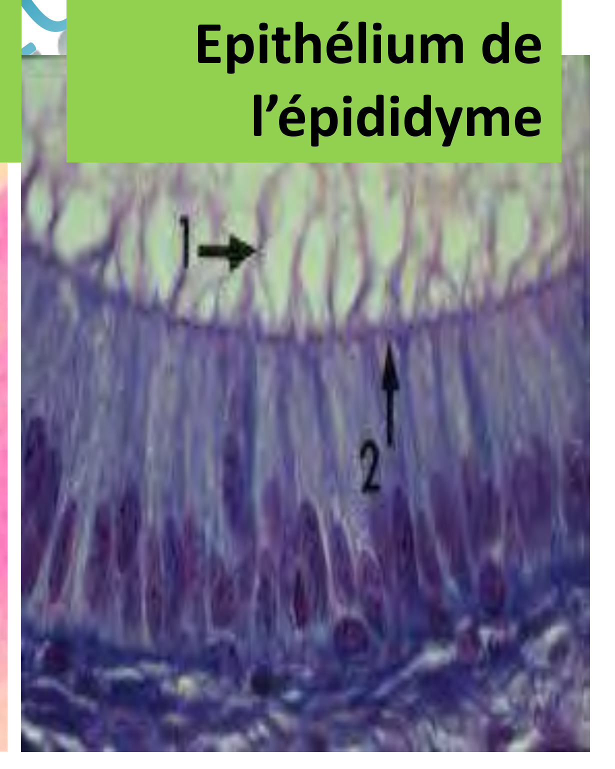
Epithélium intestinal



Tissu musculaire cardiaque

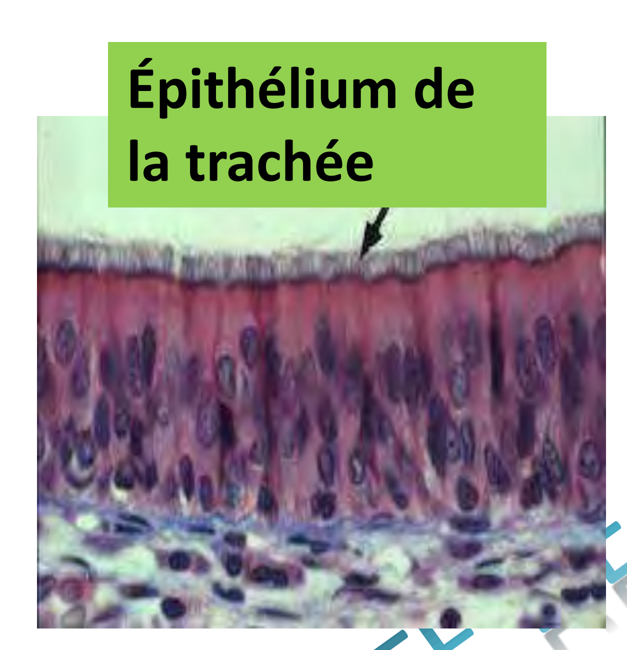


Epithélium de l'épididyme



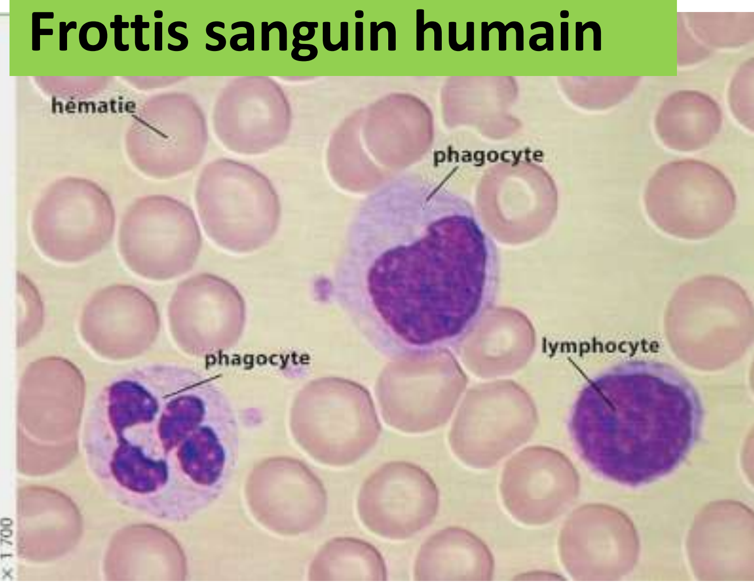
Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique

Épithélium de la trachée



cellule nerveuse

Frottis sanguin humain

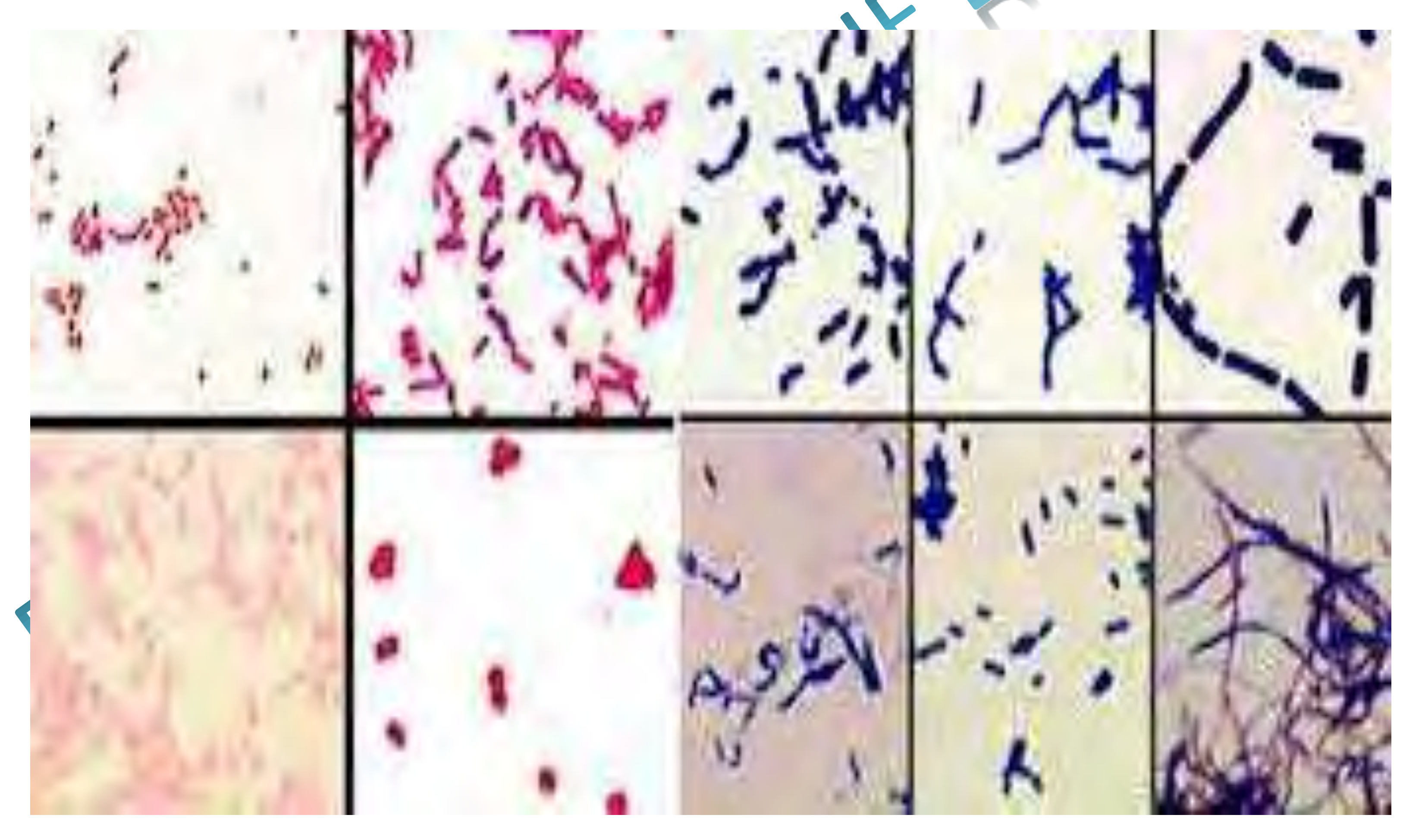




Paramécie organisme unicellulaire

Objectif 3 : Indiquer les domaines d'application de la microscopie photonique

L a microscopie photonique est utilisée pour l'observation de différentes formes bactériennes après coloration de Gram



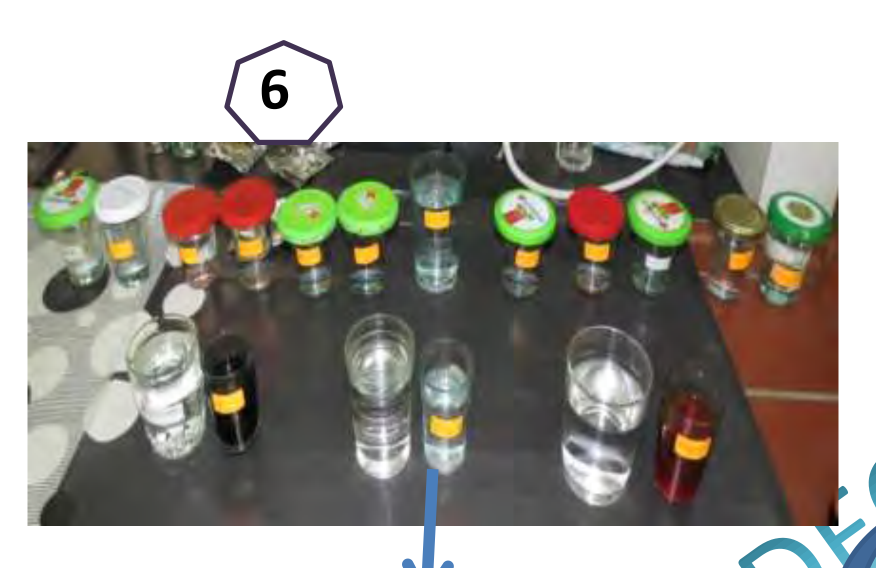
Objectif 4 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope à fond clair (la technique histologique).

Les étapes de la technique histologique:

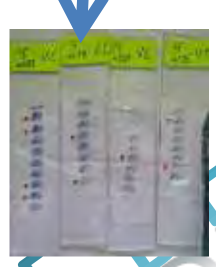
- **Prélèvement de l'organe à étudié .**
- **Fixation chimique : figer (conserver) les structures cellulaires tel quelles étaient à l'état du vivant .**
- **Déshydratation : enlever l'eau intracellulaire .**
- **Inclusion : imprégner le tissu dans la paraffine**
- **Microtomie :obtenir des coupes de l'ordre de 2- 10µm**
- **Coloration chimique : augmenter les contrastes naturels faibles (images colorées)**

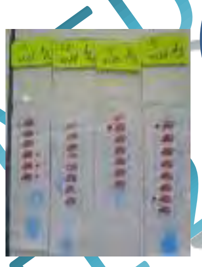

Procédé de la technique histologique
intestin de cobaye
1
2
3
4
5

6









Observation de la préparation au microscope photonique



Le grossissement G total du microscope qui a permis de réaliser l'observation est égal au produit du grossissement de l'objectif par le grossissement de l'oculaire .

G total = G de l'objectif X G de l'oculaire

Objectifs spécifiques

2 - Le microscope photonique à fluorescence

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope optique à fluorescence.

Objectif 2 : Déterminer les domaines de son utilisation.

Objectif 3 : Définir un fluorochrome ou fluomarqueur **.**

Objectif 4 : Citer des exemples de fluomarqueurs utilisés (fluorescéine, rhodamine)

Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence**.**

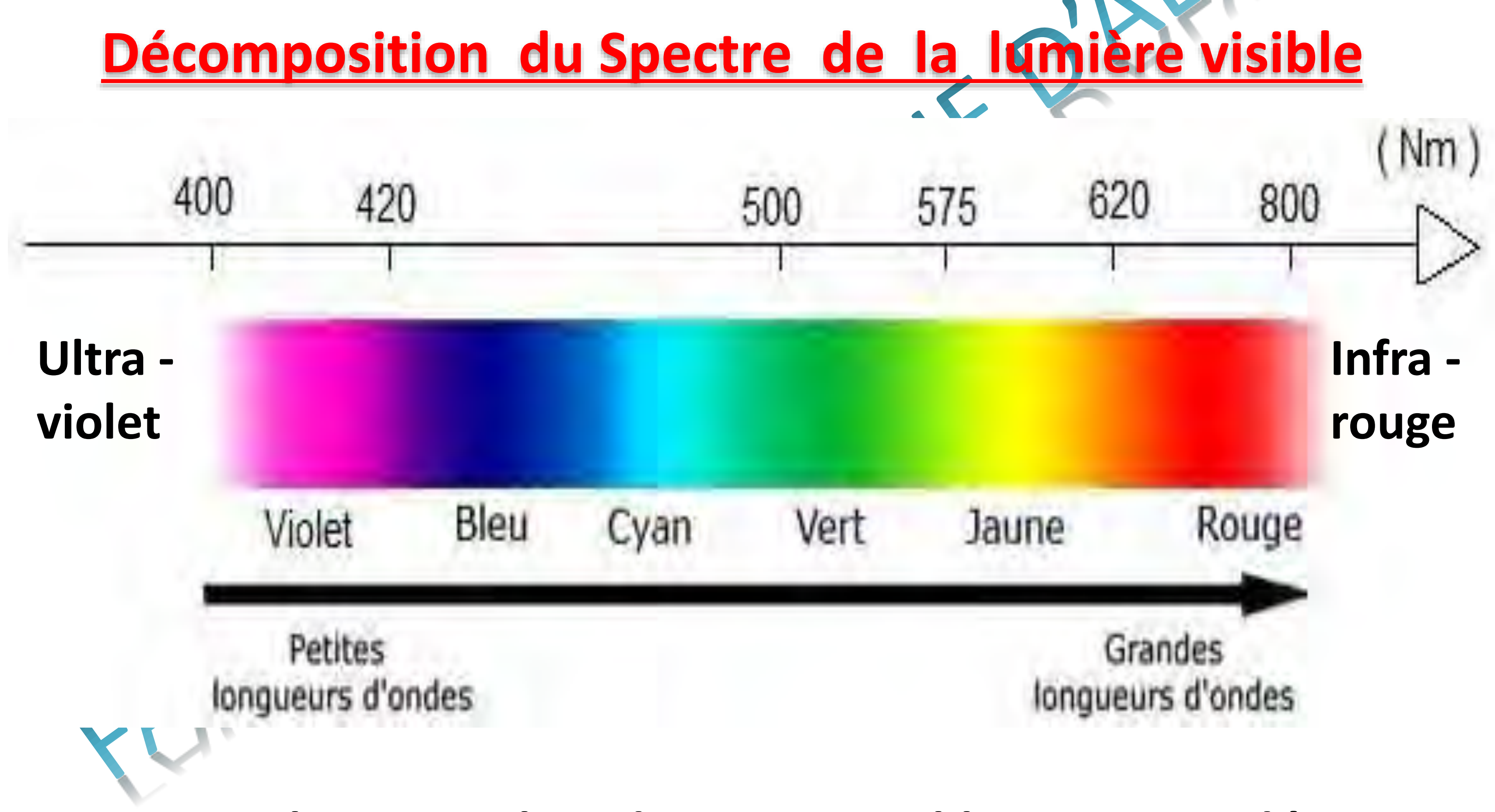
Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope optique à fluorescence

Le MP à fluorescence = MO qui détecte une lumière fluorescente



Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Décomposition du Spectre de la lumière visible



Chaque couleur du spectre visible correspond à une longueur d'onde déterminée

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Interaction lumière -- fluorochrome

Lumière d'excitation

Lumière d'émission

GFP

FITC

Rhodamine

Cy3

Alexa 568

Cy5

420 nm

460 nm

500 nm

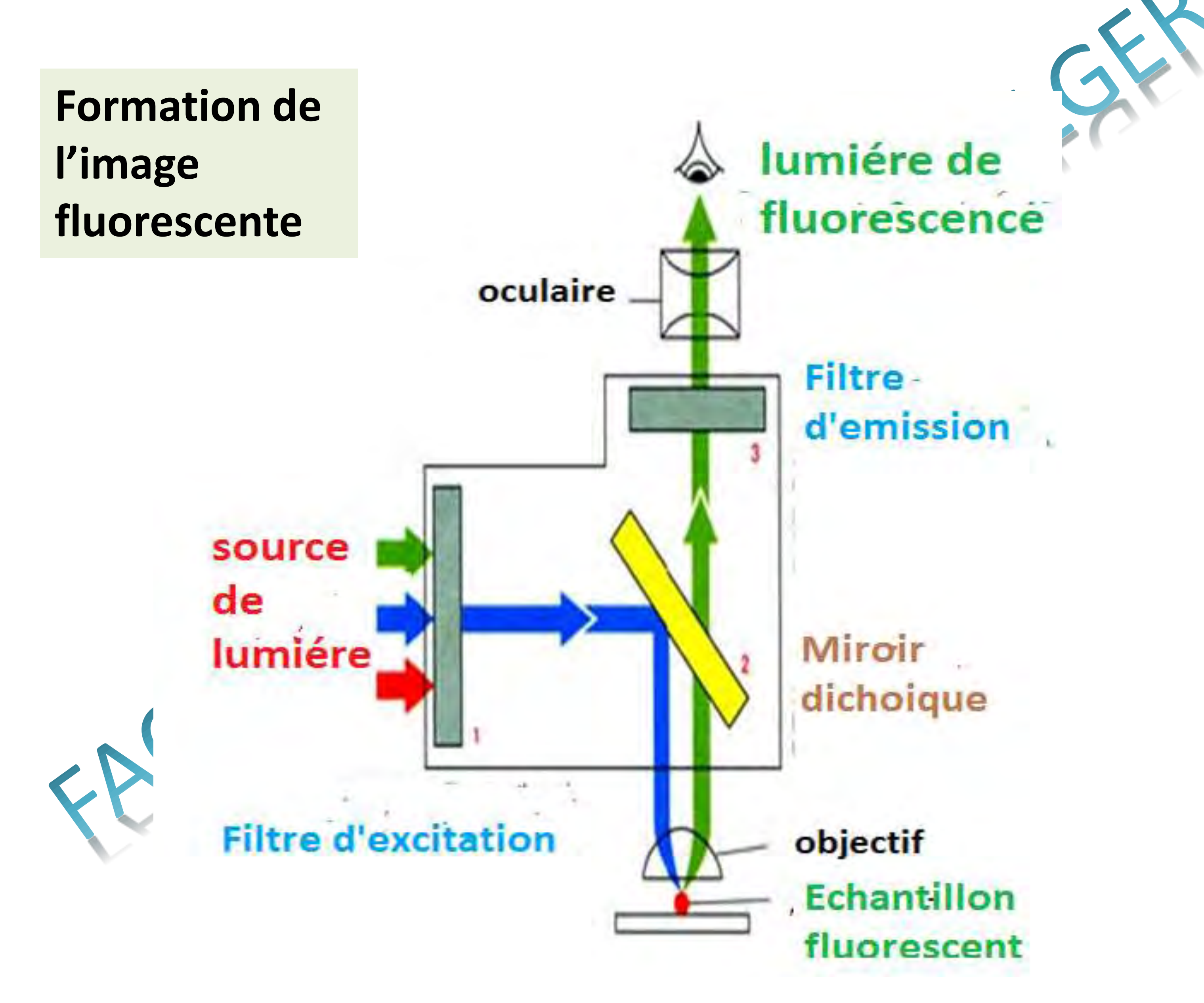
540 nm

580 nm

620 nm

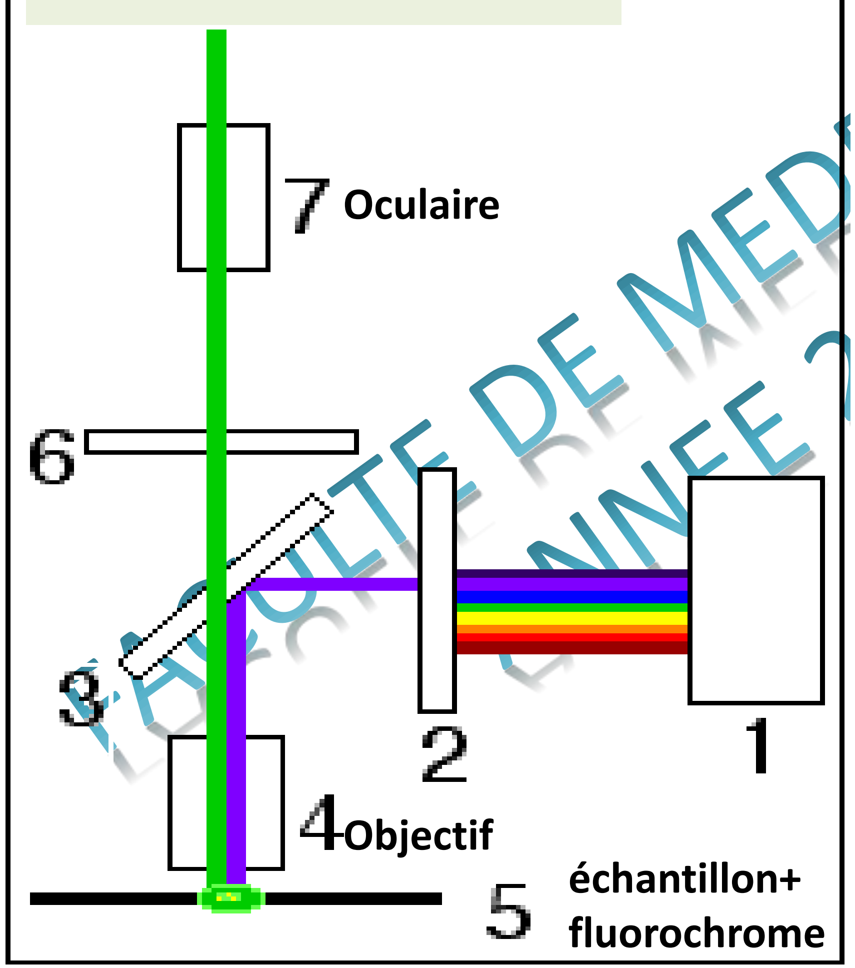
660 nm

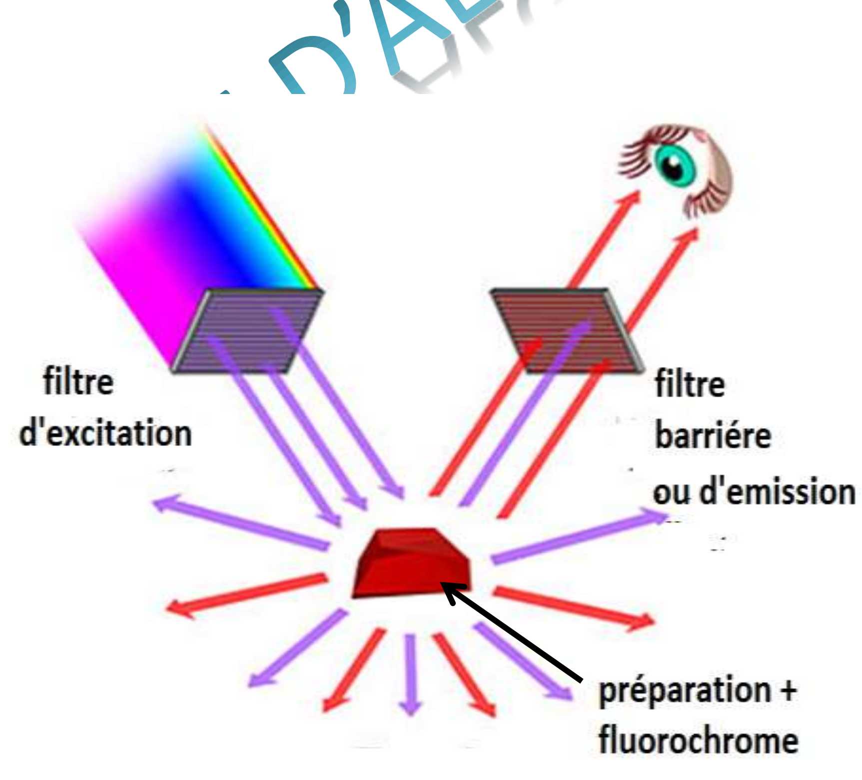
Formation de l'image fluorescente



Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Optique simplifiée du microscope à fluorescence





Ce type de microscope, permet de visualiser la fluorescence émise par les marqueurs fluorescents introduits dans l'échantillon à étudier . Un jeu de filtres est indispensable

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Le MO à fluorescence est équipé de :

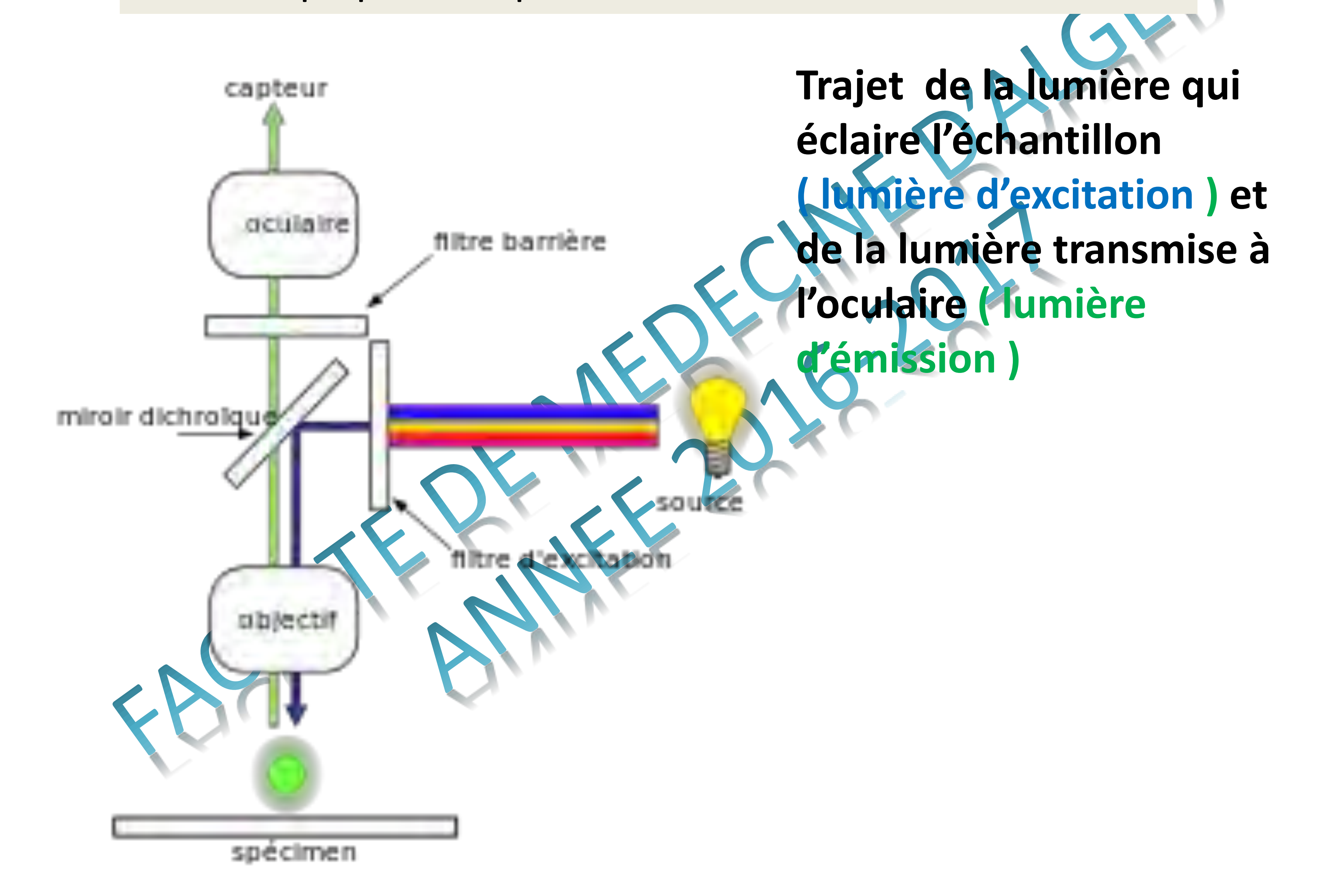
1 **Lampe Source de lumière**

2 **1 Filtre d'excitation** → **Sélectionne la longueur d'onde incidente qui va excitée(absorbée) le fluorochrome**

3 **Un miroir dichroïque** → **Réfléchi la longueur d'onde incidente vers la préparation**

6 **1 filtre d'émission** → **Sélectionne la longueur d'onde émises par le fluorochrome**

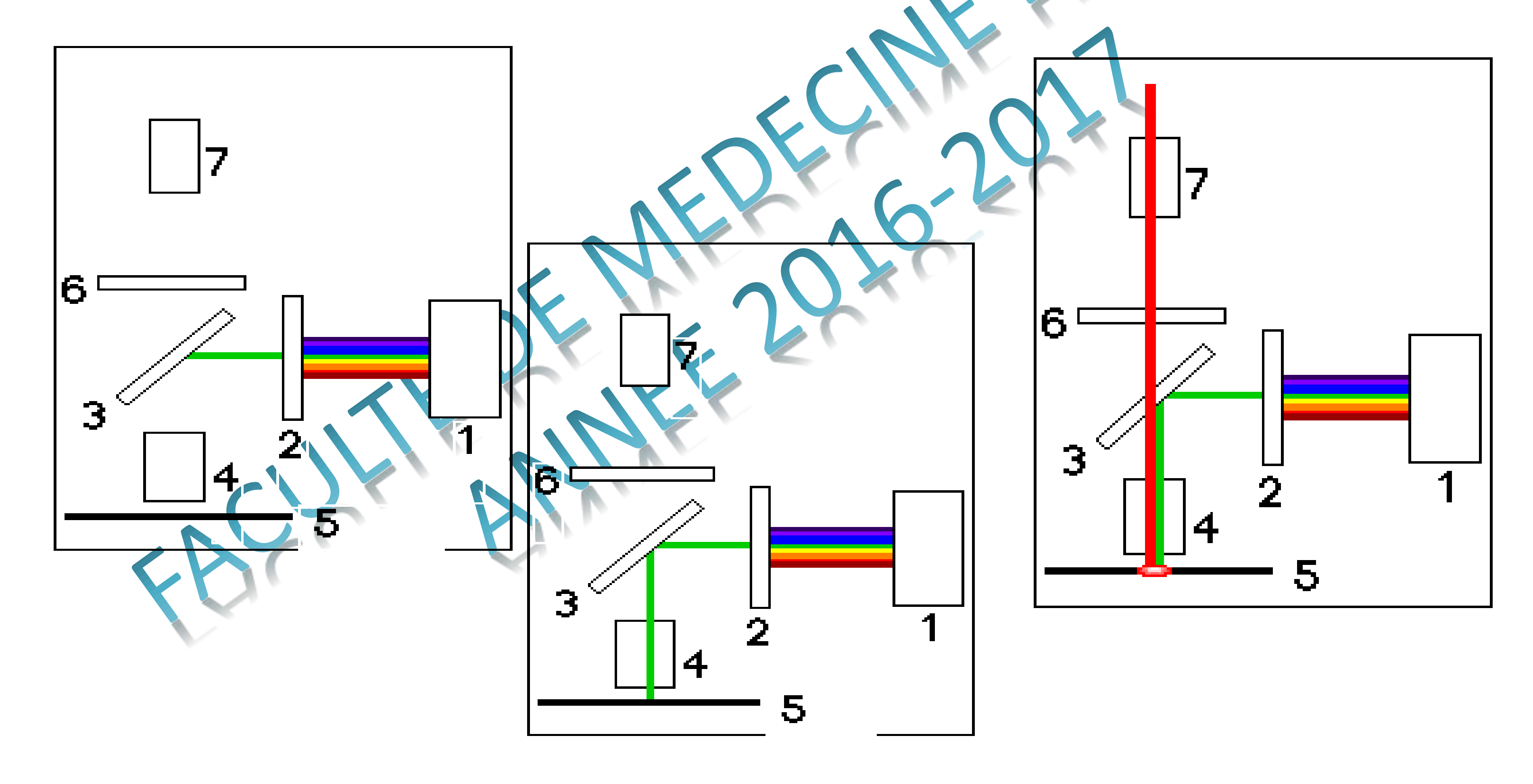
Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence



Trajet de la lumière qui éclaire l'échantillon (lumière d'excitation) et de la lumière transmise à l'oculaire (lumière d'émission)

Objectif 1 : Donner le principe de fonctionnement du microscope photonique à fluorescence

Exercice : ordonner les représentations ci-dessous



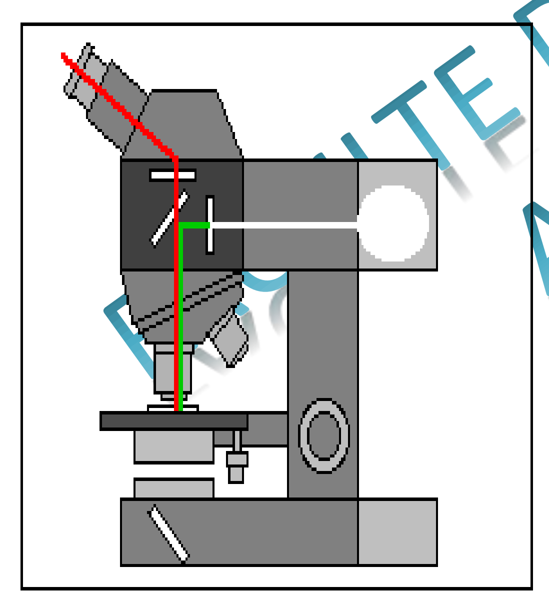
Objectif 2 : Définir un fluorochrome ou fluo marqueur

Définition d'un fluorochrome : c'est une substance chimique excitable par la lumière. Elle est capable d'absorber une énergie lumineuse haute dite **lumière d'excitation** et de la réémettre sous forme d'une lumière d'énergie plus faible **dite lumière de fluorescence.**

- **Chaque molécule fluorescente (fluorochrome= fluorophore) a des spectres d'excitation et d'émission qui lui sont propres .**

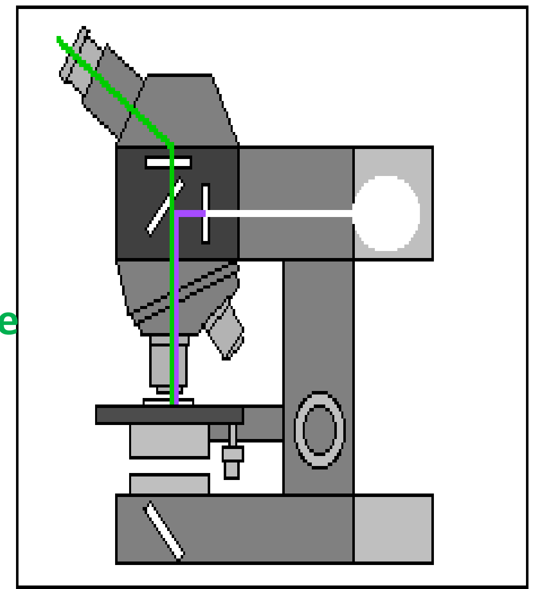
Objectif 3 : citer des exemples de fluorochromes

Fluorochromes	Rhodamine	Fluorescéine	DAPI
Lumière d'excitation	vert	bleu	UV
Lumière d'émission	rouge	vert	bleu



Observation en utilisant le jeu de filtres spécifiques à la rhodamine

Observation en utilisant le jeu de filtres spécifiques à la fluorescéine



Objectif 4 : Déterminer les domaines d'application de la microscopie à fluorescence

- Le microscope en fluorescence permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents (chlorophylle ,vitamine A , B2 ,B6, E...), ou des molécules rendues fluorescentes pour mieux les observer et éventuellement suivre leur parcours .

- Etudier au niveau cellulaire et moléculaire les structures biologiques, leur fonctionnement et leurs interactions (division cellulaire, motilité, transport, sécrétion, communication neuronale, etc.).

- Elle s'applique maintenant en routine dans le domaine du diagnostic médical, de la recherche biomédicale et pharmaceutique, en microchirurgie , cancérologie ....

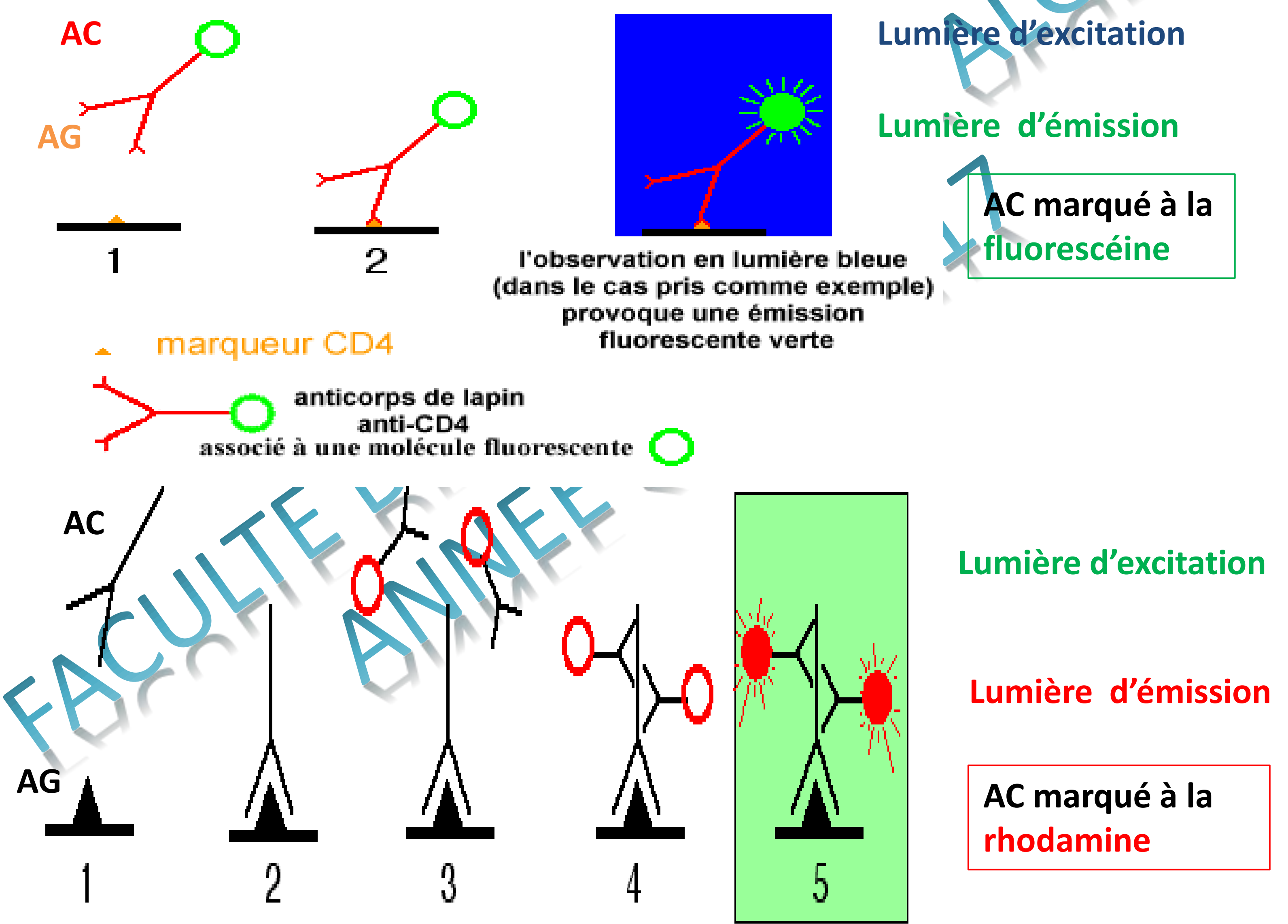
Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence

Application de la technique de fluorescence

Pour induire la fluorescence , les molécules fluorescentes (fluorochromes) sont liées à des AC qui vont se fixer spécifiquement sur les molécules recherchées (AG) selon le principe de la réaction immunitaire AC -AG ce qui rendra facile la détection des complexes AG - AC

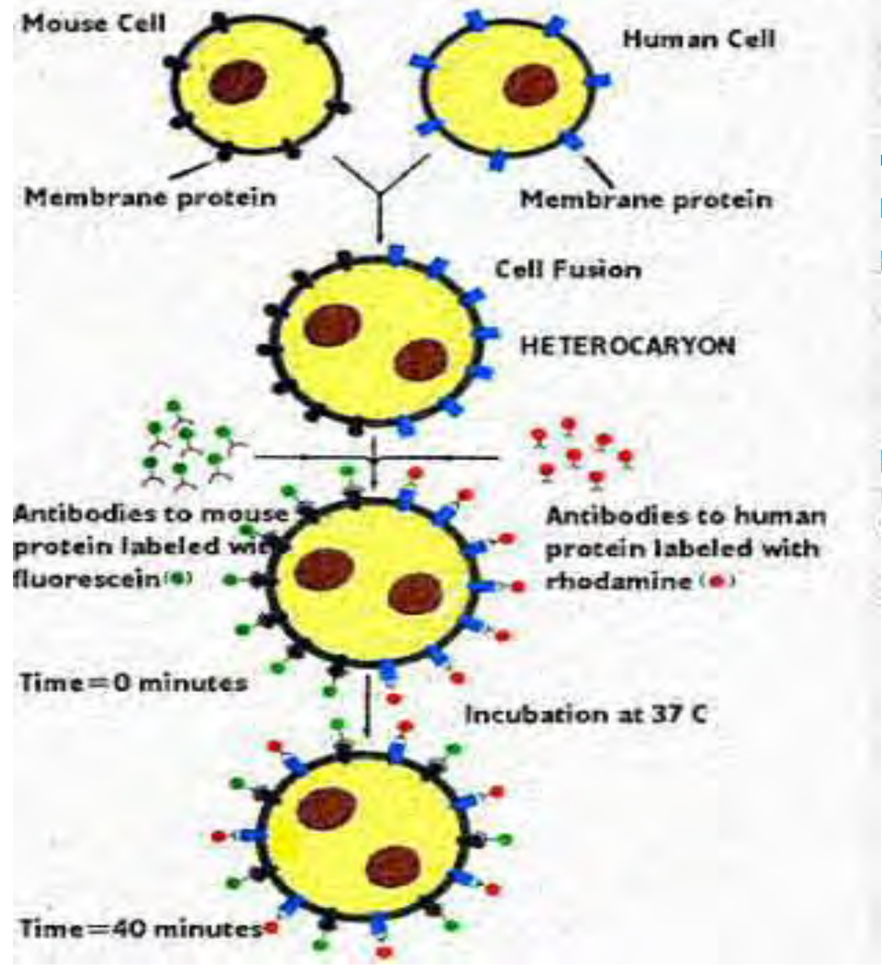
→ **Technique d' immunofluorescence ou d'immuno-marquage .**

Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence

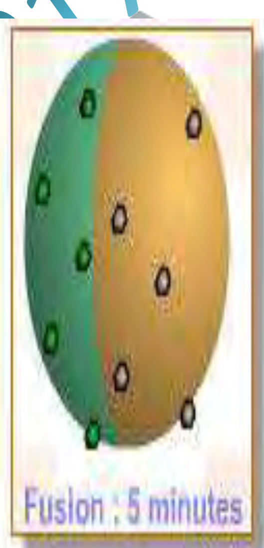


Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence.

1 –Détecter et Suivre la fluidité des **protéines membranaires** (expérience de Fry – EDIDIN P .35)





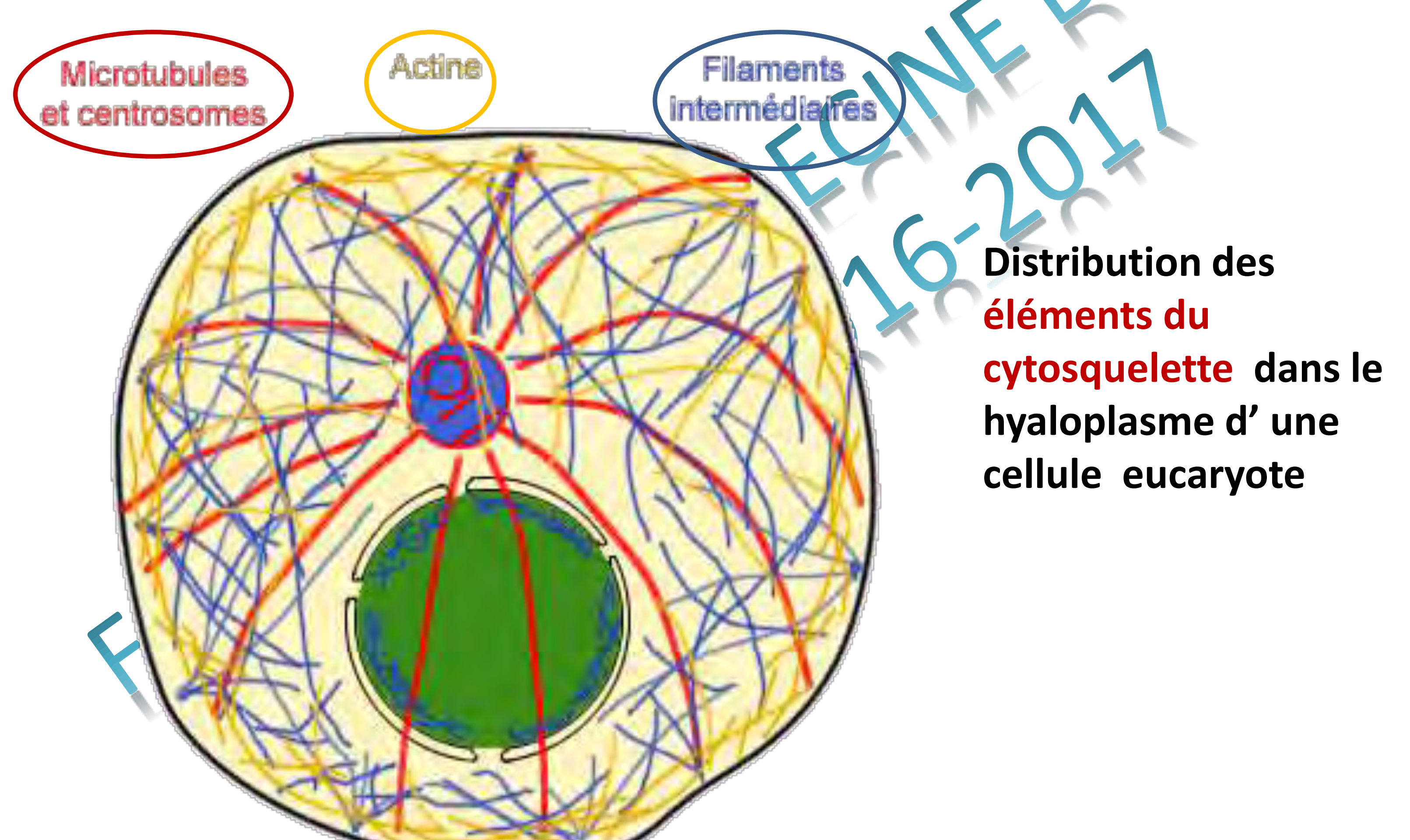




Résultats : déplacement des protéines par diffusion latérale dans le plan membranaire .

Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence.

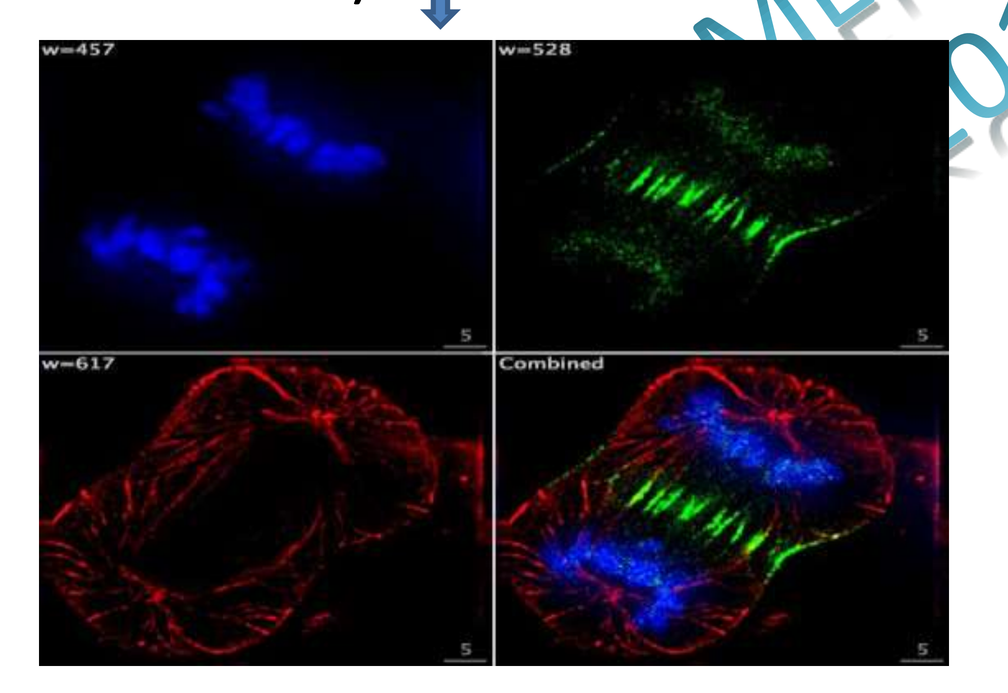
2 - Détecter , localiser , quantifier des protéines cellulaires comme les hormones, récepteurs, **les protéines du cytosquelette** ……

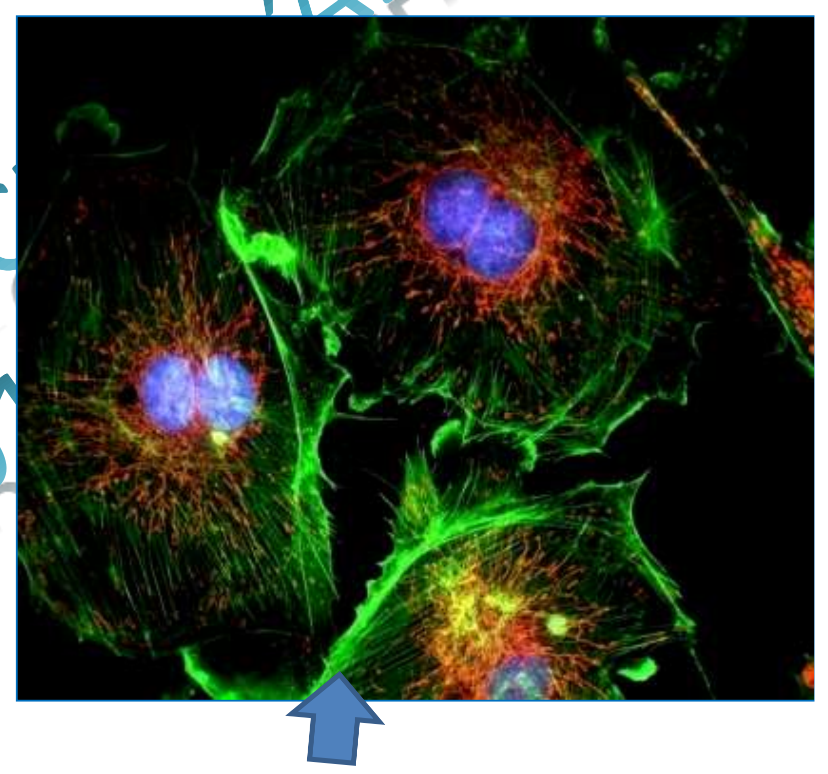


Distribution des éléments du cytosquelette dans le hyaloplasme d' une cellule eucaryote

2 -Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, Cytosquelette….)

Mitose observée au microscope à fluorescence en utilisant plusieurs fluorochromes (bleu les chromosomes ,rouge les microfilaments d'actine ,vert les microtubules)



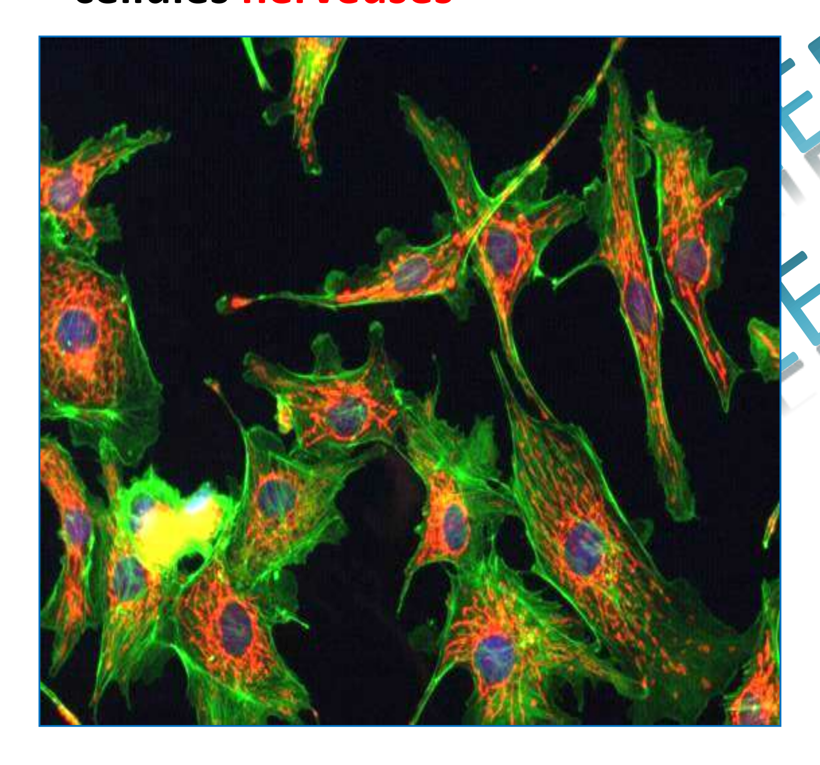


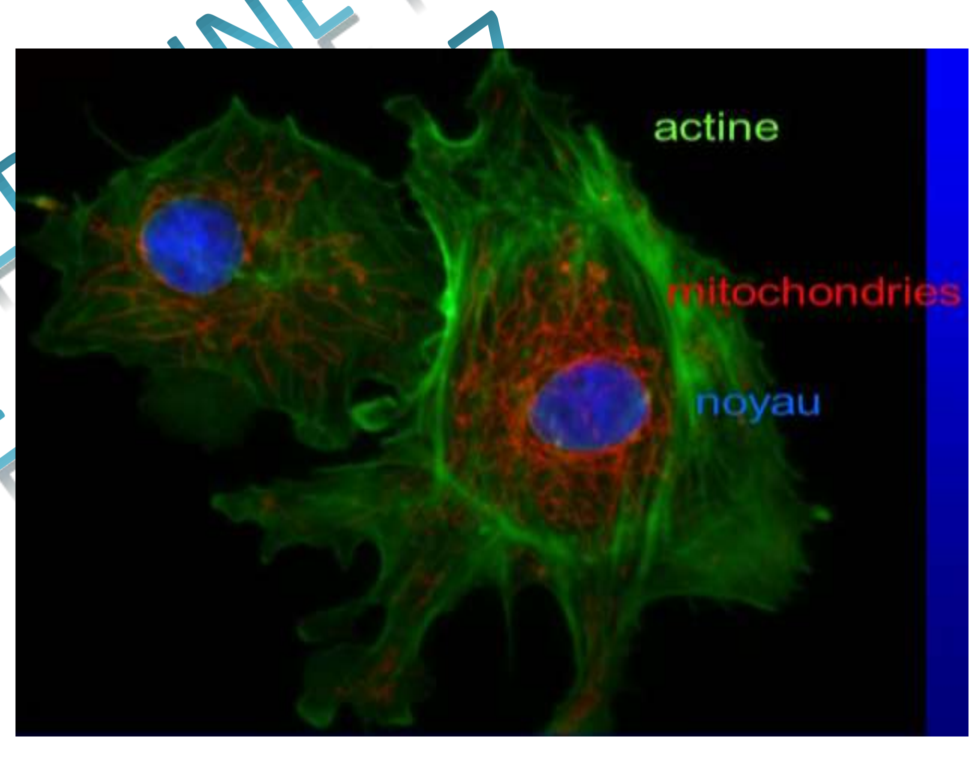
Répartition des éléments du cytosquelette dans des cellules en division (microfilaments d'actines en vert , microtubules en rouge) noyau en bleu par DAPI

Objectif 5 : Citer des exemples de composés cellulaires détectables en microscopie à fluorescence.

2 -Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, **Cytosquelette….**)

Répartition des éléments du cytosquelette dans des cellules nerveuses





Visualisation des mitochondries (AC anti – ATP synthase marqué à la rhodamine)

Objectifs spécifiques

B – les microscopes électroniques

1 - le microscope électronique à transmission

Objectif 1 :Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

Objectif 2 :Déterminer les domaines de son utilisation.

Objectif 3 :Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation ultrastructurale (technique des coupes minces et contraste positif).

Objectif 4 :Lister les différents procédés de contraste électronique (coloration positive, négative, autoradiographie).

Objectif 5 :Indiquer l'apport de chaque procédé de contraste électronique dans l'analyse morphologique d'un échantillon.

Les microscopes électroniques

Le microscope électronique à transmission ou MET

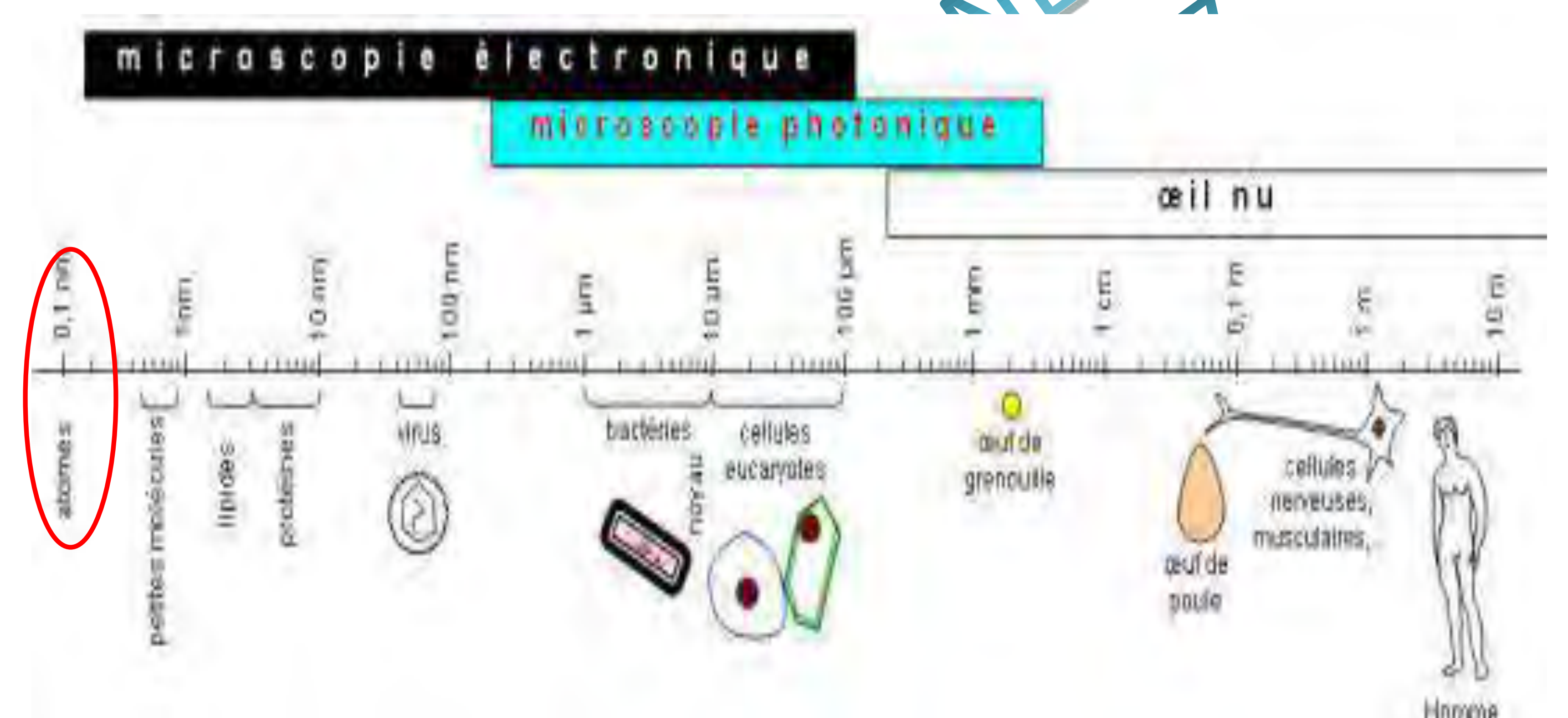
Le microscope électronique à balayage ou MEB



Observation sous vide

1- Le microscope électronique à transmission

Echelle d'observation du vivant



Un pouvoir de résolution 200 000 fois supérieur à celui de l'oeil humain ; de 0,2 nm (2 Å) et même jusqu'à 10 Å pour certains MET .

Objectif 1 :Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

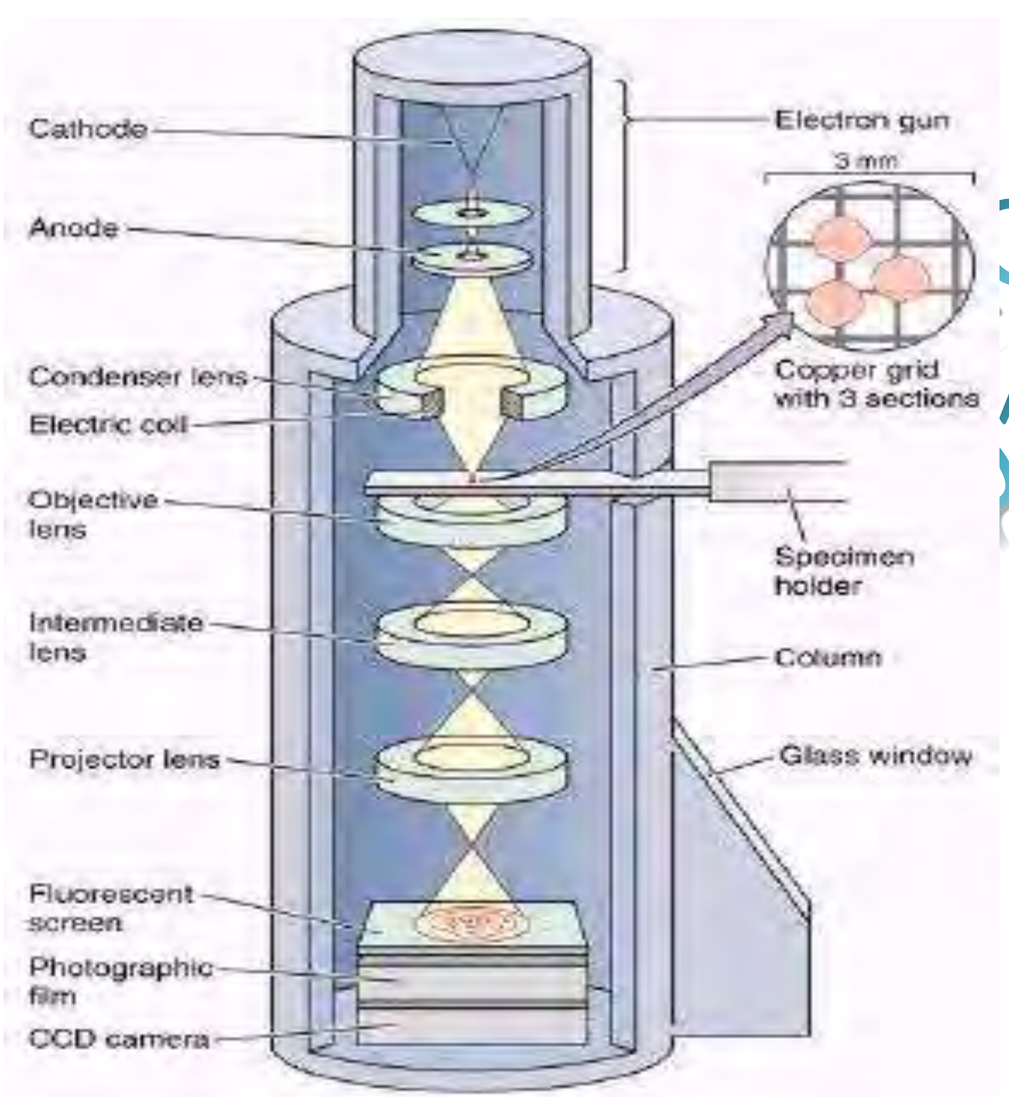


Schéma MET en coupe p.24

Principe de fonctionnement du MET.

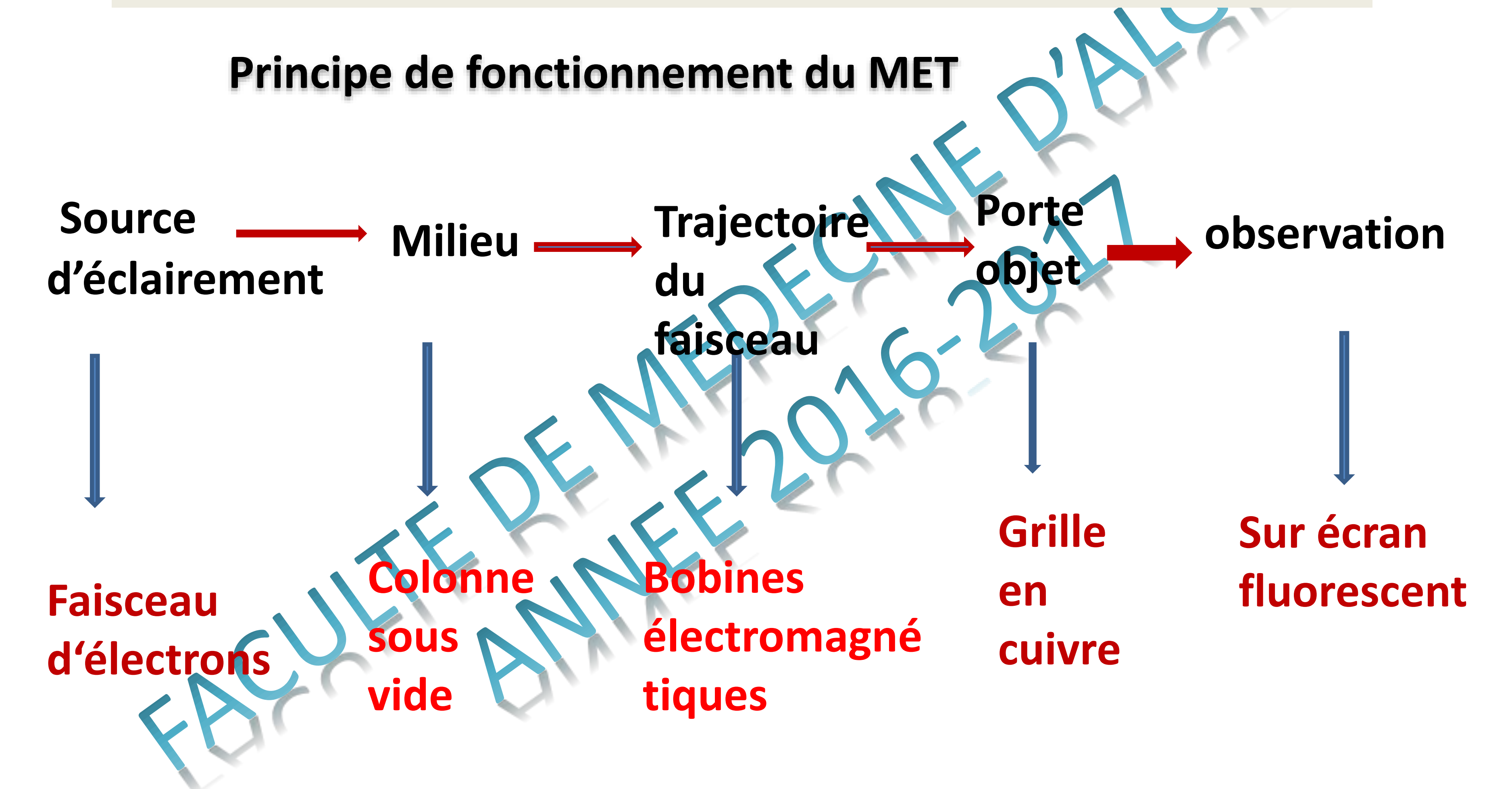
Objectif 1 :Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

Principe de transmission des électrons



Le microscope électronique à transmission (MET) fait passer le faisceau d'électrons à travers une coupe ultra-fine d'un échantillon biologique. Ce faisceau est ensuite considérablement agrandi par des lentilles électromagnétiques et vient finalement former une image sur un écran ou sur un film photographique

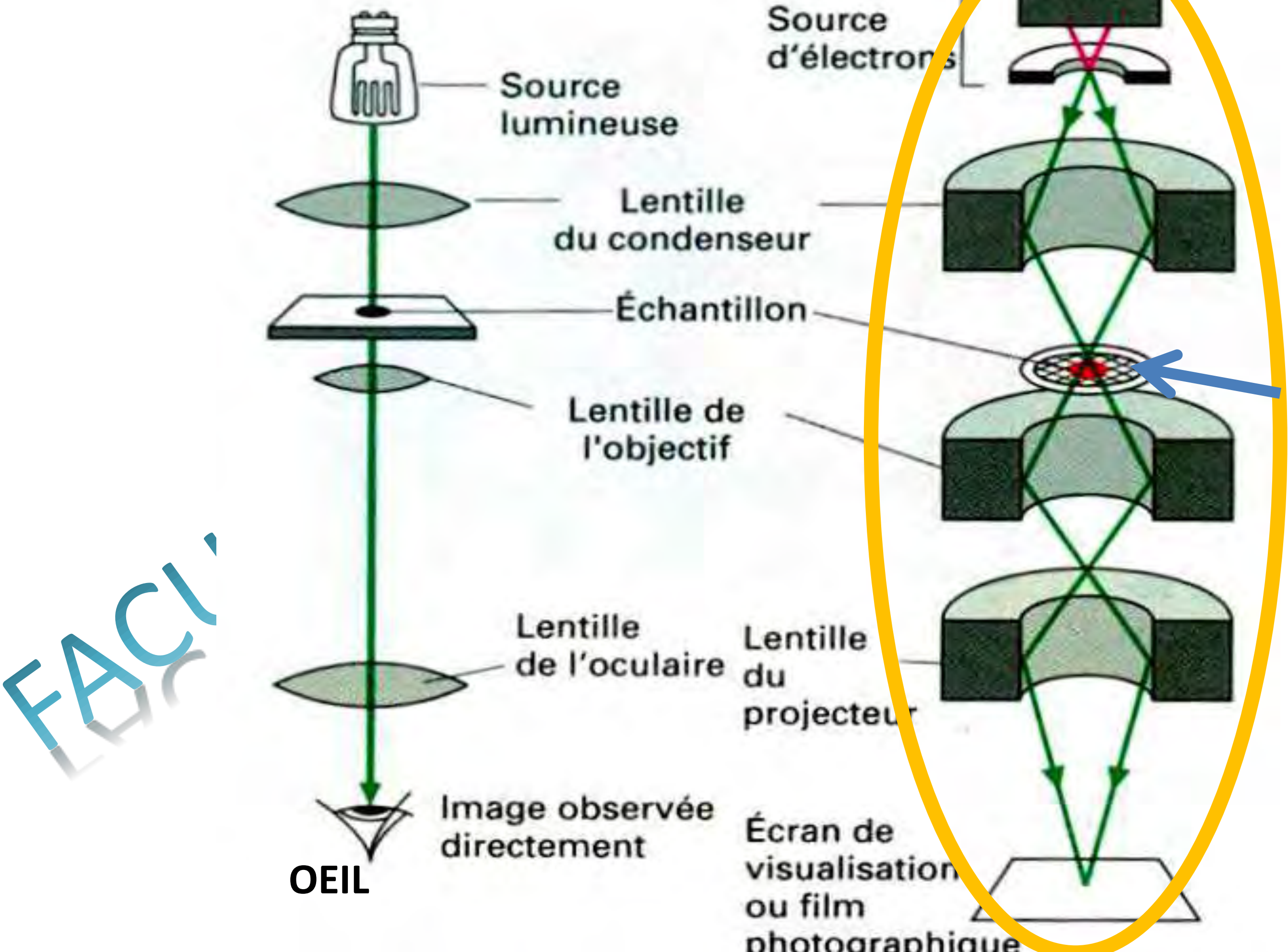
Objectif 1 :Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET)



Résultat : image en noir et blanc

Objectif 1 :Donner le principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET).

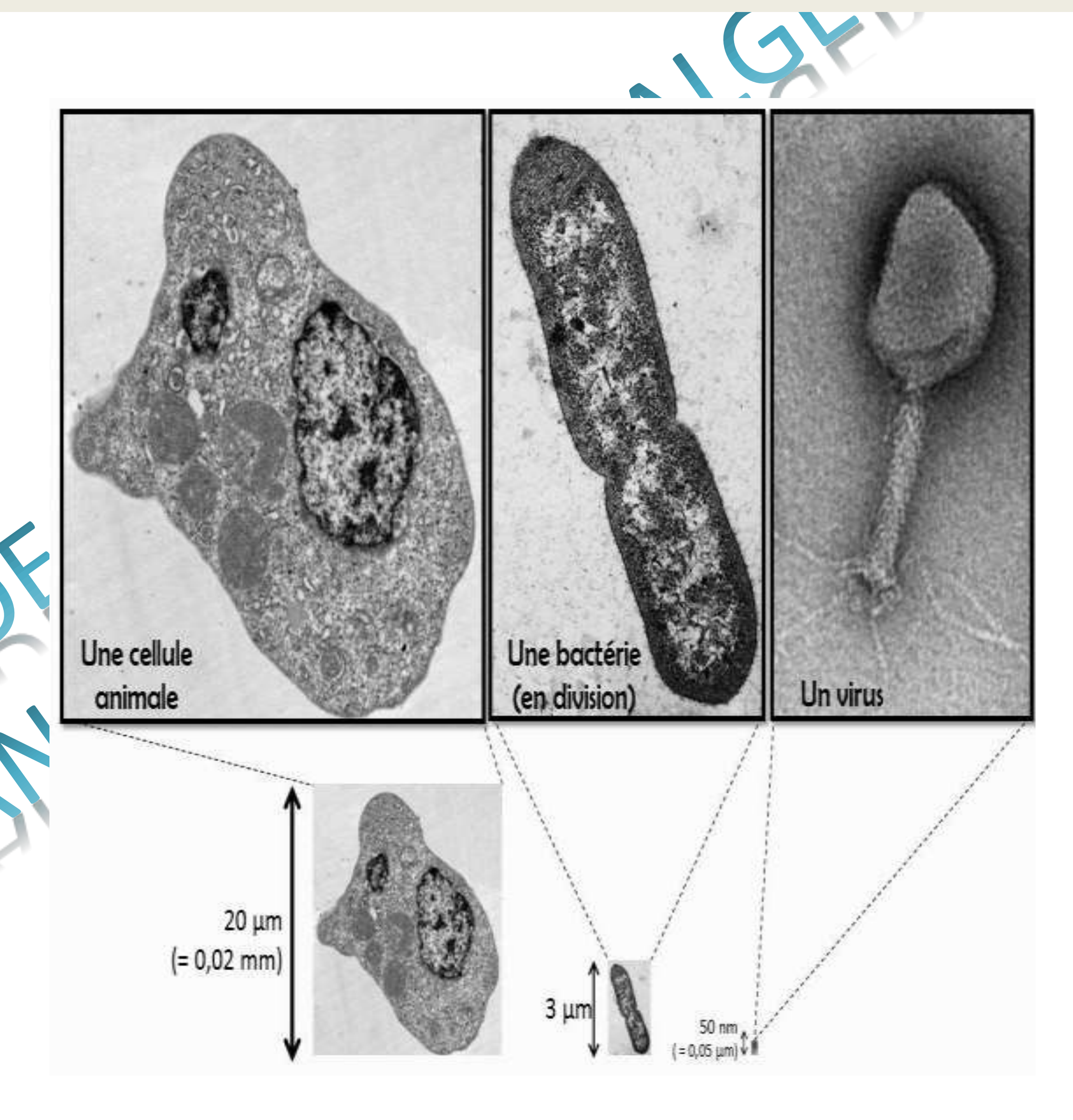
Principe de transmission dans le MO et dans le MET



Grille en cuivre

Objectif 2 : Déterminer les domaines de son utilisation.

Observation au MET à fort grossissement



Observation à faible grossissement

Objectif 2 : Déterminer les domaines d' utilisation du MET

- **A permis de découvrir l'ultrastructure de la cellule révélant avec précision l'existence d'organites cellulaires: noyau , mitochondries , lysosomes , vacuoles , vésicules , appareil de golgi , RE , ribosomes , cytosquelette centrioles…après coloration positive**

- **L'aspect morphologique de microorganismes (bactéries ..) de virus, d'organites cellulaires par coloration négative**

- **Suivre la cinétique d'un métabolisme cellulaire par autoradiographie**

Objectif 3 : Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation ultra structurale (technique des coupes minces et contraste positif) .

La Technique des coupes minces + contraste positif / Technique cytologique p. 29

Principe : réaliser des coupes ultrafines permissives aux faisceaux d'électrons et aux sels de métaux lourds .

Objectif 3 :Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue de sa caractérisation **ultra structurale** (technique des coupes minces et contraste positif) **.**

Les étapes de la technique de coupes minces

Le principe et le procédé sont les mêmes que pour la technique histologique , la différence est dans les produits et les outils utilisés .

- Fixation double aux aldéhydes + tetroxide d'osmium **.**
- Déshydratation à l'alcool + solvant de la résine
- Inclusion / imprégnation à la résine
- Coupes ultrafines de 300–600Å sur Ultramicrotome
- Coupes étalées sur grille métallique(en cuivre)
- Contraste aux sels de métaux lourds , tel l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb …
- Observation en noir et blanc

Microtomisation

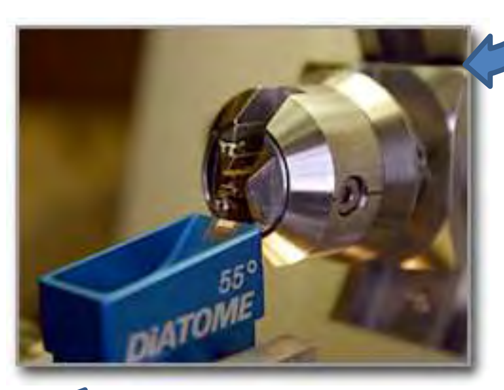


Blocs de résine + échantillon



Ultra microtome



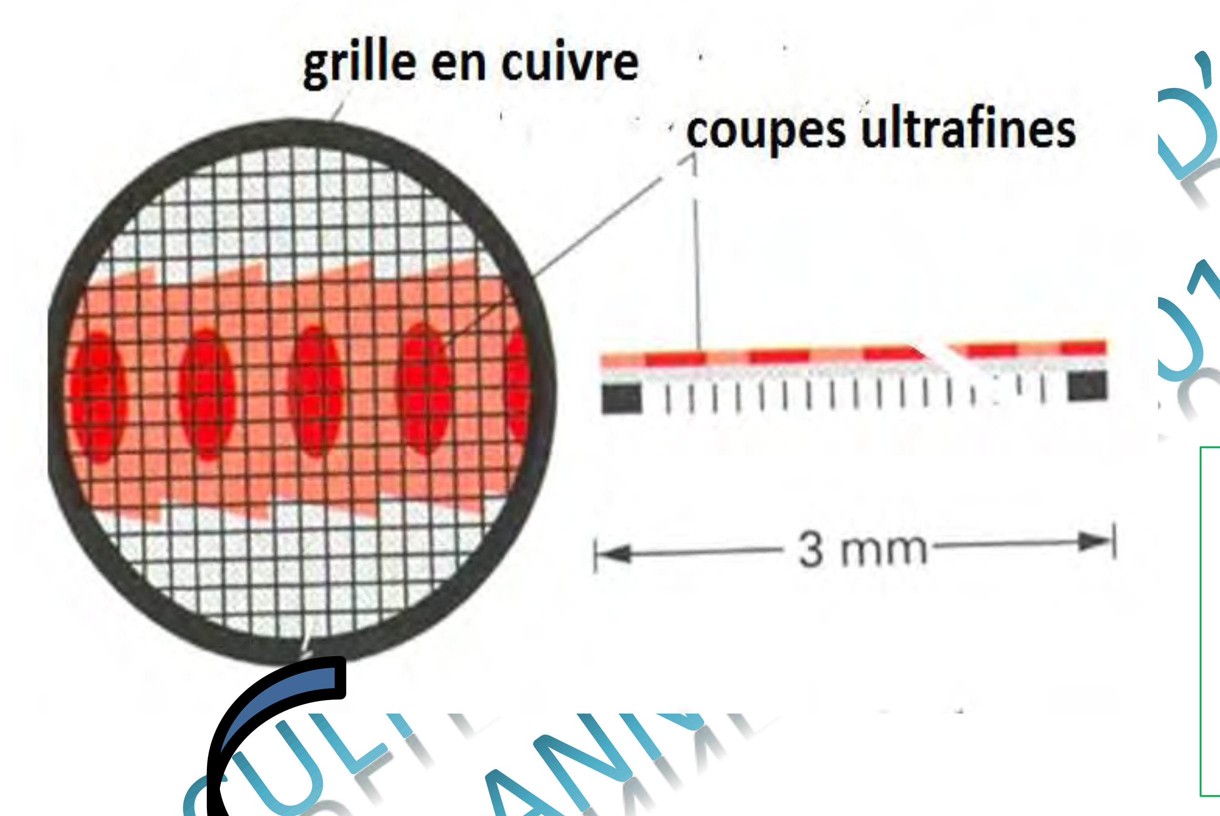






Coupes ultrafines de 500 Å

Récupération des coupes sur grille



Les atomes majeurs de la matière biologique sont transparents aux électrons d 'ou la nécessité d'utiliser des **sels de métaux lourds** .

Contraste aux sels de métaux lourds

ou **Contraste positif** (contrastes d'intensités entre noir et blanc)